



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 24 187 A 1**

⑤① Int. Cl. 5:
C 12 N 15/63
// C 12 N 15/70

②① Aktenzeichen: P 40 24 187.4
②② Anmeldetag: 30. 7. 90
④③ Offenlegungstag: 6. 2. 92

DE 40 24 187 A 1

⑦① Anmelder:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

⑦④ Vertreter:
Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦② Erfinder:
Hofer, Bernd, Dr., 3300 Braunschweig, DE; Wefel,
Reinhard, 3320 Salzgitter, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese von Plasmiden

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines
Plasmid-Konstrukts für oligonucleotid-induzierte Mutagenese,
das Plasmid-Konstrukt und ein Verwendungsverfahren.

DE 40 24 187 A 1

Beschreibung

Es sind verschiedene Verfahren unterschiedlichen Umfangs und Schwierigkeitsgrades entwickelt worden, mit denen sich eine gezielte Mutagenese einer beliebigen Stelle innerhalb eines vorgegebenen DNA-Segments mit hoher Ausbeute erreichen läßt (1 bis 13). Jedoch erfordern diese Verfahren ein zweifaches Subklonieren des DNA-Segments, und zwar zuerst in einem speziellen Mutagenese-Vektor (üblicherweise einem M13-Vektor oder einem Plasmid, das einen Replikationsursprung eines filamentösen Phagen beherbergt) und zweitens in einem Vektor, der für die Expression oder Untersuchung der mutierten DNA geeignet ist. Außerdem sind einige DNA-Fragmente viel schwieriger in einzelsträngigen (ss) Vektoren als in doppelsträngigen (ds) Vektoren zu klonieren (14). Es ist daher verständlich, daß eine stellenspezifische Mutagenese direkt mit dem Plasmid, das das interessierende Segment enthält, eine wesentliche Vereinfachung darstellen würde. So ist auch eine Anzahl derartiger Verfahren bereits beschrieben worden. Die meisten liefern jedoch entweder niedrige Ausbeute von etwa 10% oder weniger (14 bis 20) oder sind nicht ohne Einschränkungen anwendbar, insofern als sie eine singuläre (d. h. nur einmal vorkommende) Restriktionsstelle in Nachbarschaft zum Zielbereich der Mutagenese erfordern (21 bis 23). Die Methoden mit ähnlich hoher Ausbeute und genereller Anwendbarkeit (35 bis 37) sind — zumindest bei mehreren Mutagenesen mit demselben DNA-Segment — aufwendiger als das hier beschriebene Verfahren. Unlängst ist auch die Polymerase-Kettenreaktion für die gezielte Mutagenese benutzt worden (24, 38 bis 40). Ihre hohe Ausbeute von praktisch 100% für die gewünschte Mutation kann jedoch durch die Bildung zusätzlicher unerwünschter Mutationen herabgesetzt werden, die auf eine Anhäufung von Replikationsirrtümern bei der In-Vitro-Kettenreaktion zurückgehen. So hat nach 30 Amplifikationszyklen jedes einzelne mutagenisierte DNA-Molekül etwa eine unerwünschte Mutation pro 400 Basenpaare (bp) erfahren (24 und 25). Außerdem erhält man bei diesem Verfahren die Mutation in Form eines Gemisches nicht replikationsfähiger DNA-Fragmente, das zur Analyse und weiteren Verwendung der Mutation erst noch wieder in einen Vektor inseriert werden muß.

Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines mutierten Plasmids, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (a) das Plasmid an einer vorzugsweise nur einmal vorkommenden Schnittstelle (C) schneidet, die außerhalb des zu mutagenisierenden Bereichs liegt, und die Enden so modifiziert, daß sie nicht mehr ligierbar, wohl aber noch exonucleolytisch abbaubar sind,
- (b) aus dem in die Stufe (a) einzusetzenden Plasmid den zu mutagenisierenden Bereich herausschneidet, den herausgeschnittenen Bereich entfernt und das geschnittene Restplasmid isoliert,
- (c) das gemäß Stufe (a) geschnittene und modifizierte Plasmid und das gemäß Stufe (b) erhaltene geschnittene Restplasmid mischt, durch De- und Rehybridisierung der DNA-Doppelstränge zwei partiell einzelsträngige komplementäre Ringmoleküle ("gapped circles") bildet, die den Zielbereich der Mutagenese in einzelsträngiger Form enthalten,
- (d) an den ss-Bereich des einen Ringmoleküls ein mutagenes Oligonucleotid bindet,
- (e) das erhaltene Substratgemisch enzymatisch zu vollständig doppelsträngigen zyklischen Plasmiden ergänzt, bei denen ein Einzelstrang allerdings nicht ligiert ist,
- (f) einem partiellen exonucleolytischen Abbau unterwirft und
- (g) mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen inkubiert, deren Erkennungssequenzen in dem Ringmolekül, das den mutierten Strang enthält, nur solange vorkamen, solange der mutierte Teil dieses Ringmoleküls nicht in Stufe (f) einzelsträngig gemacht worden war, und dadurch selektiv nur das andere Ringmolekül linearisiert (und damit für die folgende Transformation unwirksam macht),
- (h) einen beliebigen Bakterienstamm mit dem Reaktionsgemisch transformiert, ein Kulturmedium mit dem Transformationsprodukt inokuliert und
- (i) die transformierten Zellen auf das in gewünschter Weise mutagenisierte Plasmid analysiert.

Man kann dieses Verfahren zur Herstellung eines Plasmids mit mutagenisiertem DNA-Bereich auch so durchführen, daß man zwischen den Stufen (g) und (h) nach Inaktivierung oder Abtrennung des Restriktionsenzym bzw. der Restriktionsenzyme die Lücke im verbliebenen Ringmolekül mit Hilfe einer DNA-Polymerase wieder auffüllt.

Man kann die beiden vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren auch als ein einziges Verfahren mit zwei Abschnitten ansehen, bei dem man den ersten Abschnitt (a—c) für ein gegebenes Plasmid mit einem gegebenen Zielbereich nur einmal durchführen wird, während der zweite Abschnitt (d—h) die individuellen Mutagenesen betrifft. Ein schematischer Überblick über beide Abschnitte ist in Fig. 1 gegeben. Das gezeigte Plasmid gliedert sich durch die Restriktionsstellen A und B in zwei Segmente. Das schwarze Segment soll die Zielstelle bzw. die Zielstellen für eine Mutagenese enthalten. Es wird daher als Zielsegment bezeichnet. Das weiße Segment wird als Nicht-Zielsegment bezeichnet. Nachstehend wird die Erfindung anhand von Fig. 1 näher erläutert.

Herstellung eines Plasmids mit mutagenisiertem DNA-Bereich:

1. Das Plasmid wird an einer vorzugsweise nur einmal vorkommenden Restriktionsstelle (C) geschnitten, die im Nicht-Zielsegment liegt. Die 5'-Enden werden dephosphoryliert.
2. Das Plasmid wird an den Restriktionsstellen A und B (die identisch sein können) geschnitten und das resultierende Nicht-Zielsegment wird isoliert.
3. Die DNA-Moleküle aus den Stufen 2 und 3 werden gemischt, dehybridisiert und rehybridisiert. Dabei werden zwei komplementäre Ringmoleküle mit Lücke gebildet. Eines dieser Ringmoleküle ist das Substrat

für alle Mutagenesen, deren Zielstellen in dieser speziellen Lücke liegen.

4. Das für die Mutagenese ausgewählte Oligonucleotid wird an die Lücke des zu ihm (bis auf die Mutation) komplementären Ringmoleküls hybridisiert.

5. Die Ringmoleküle werden enzymatisch elongiert und ligiert, so daß man vollständig doppelsträngige DNA-Ringmoleküle erhält.

6. Die Ringmoleküle werden so lange einem exonucleolytischen Abbau unterworfen, bis der Wildtyp-Strang des in einem Strang mutierten Ringmoleküls bis mindestens zur und einschließlich der Position der Mutation im Gegenstrang abgebaut worden ist.

7. Das Reaktionsgemisch wird mit einem oder mehreren solcher Restriktionsenzyme inkubiert, deren Erkennungssequenzen im mutierten Ringmolekül ausschließlich in dem nunmehr einzelsträngigen Bereich vorkommen. Dadurch ist das mutierte Ringmolekül gegen diesen Restriktionsschnitt geschützt, während das komplementäre (nicht mutierte) Ringmolekül, dessen jetzt einzelsträngiger Bereich in einem anderen Ringsegment liegt, geschnitten (und dadurch für den nachfolgenden Transformationsschritt inaktiviert) wird.

8. Ein beliebiger Bakterienstamm wird mit den Produkten aus Stufe 7 transformiert. Die Zellen werden ausplattiert.

9. Übernacht-Kulturen werden mit einigen Kolonien inokuliert. Ihre Plasmide werden in kleinem Maßstab gewonnen.

10. Die DNA-Moleküle werden im Hinblick auf die gewünschte Mutation analysiert, beispielsweise durch Einzelbasensequenzierung oder durch Restriktionsverdau.

Die grundlegende Voraussetzung für eine oligonucleotid-induzierte Mutagenese ist ein Ziel-DNA-Bereich in ss-Form. Wie man Fig. 1 (Stufen 1 bis 3) entnehmen kann, kann man diese Voraussetzung mit einem beliebigen ds-Plasmid dadurch schaffen, daß man ein Ringmolekül mit Lücke bildet, das durch Hybridisieren unterschiedlich gespaltenen Formen des Plasmids erhalten wird (14). Die Bildung eines doppelsträngigen Ringmoleküls mit Lücke bietet zusätzliche Vorteile im Vergleich zur Verwendung von vollständig einzelsträngigen Ringmolekülen (1, 4 und 6):

1. Sie verkürzt und vereinfacht damit die In-Vitro-DNA-Synthese.

2. Sie schützt das übrige DNA-Molekül gegen eine Mißhybridisierung durch das mutagenisierende Oligonucleotid, die zu unerwünschten Mutationen führen kann.

3. Die Möglichkeit, daß der Zielbereich für das Oligonucleotid durch die Bildung stabiler Sekundärstrukturen mit anderen einzelsträngigen Bereichen des Moleküls maskiert wird, ist beträchtlich gemindert.

Die erfindungsgemäße Strategie zur Bildung eines Ringmoleküls mit Lücke liefert also zwei komplementäre Ringmoleküle mit Lücke in gleicher Menge (Fig. 1: Stufen 1 bis 3). Nur eines dieser Ringmoleküle führt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Bildung eines Plasmids mit mutiertem DNA-Bereich. Daher wird das andere unwirksam gemacht. Dazu wird dieses Molekül linearisiert, denn E.-coli-Zellen sind durch lineare Moleküle ca. 1000fach schlechter transformierbar als durch zirkuläre Moleküle (29). Die selektive Linearisierung erreicht man, wenn man a) zur Bildung der Ringmoleküle (Fig. 1, Stufe 3) das an Position C geschnittene Molekül (Fig. 1, Stufe 1) in solcher Form (z. B. 5'-dephosphoryliert) einsetzt, daß es (während der In-Vitro-Mutagenese) nicht ligierbar, wohl aber exonucleolytisch abbaubar ist, b) das Reaktionsgemisch im Anschluß an die In-Vitro-Mutagenese (Fig. 1, Stufen 4 und 5) einem partiellen exonucleolytischen Abbau unterwirft, der bei den beiden komplementären Ringmolekülen in entgegengesetzten Richtungen verläuft (Fig. 1, Stufe 6) und c) eine Spaltung mit einer oder mehreren Restriktionsendonucleasen anschließt, die nur solche Sequenzen schneiden, die ausschließlich im unwirksam zu machenden der beiden Ringmoleküle noch in doppelsträngiger Form vorliegen (Fig. 1, Stufe 7).

Durch den partiellen exonucleolytischen Abbau (Fig. 1, Stufe 7) erreicht man zusätzlich, daß der Wildtyp-Strang des mutierten Ringmoleküls unwirksam gemacht wird, da er mindestens bis zur und einschließlich der Position der Mutation abgebaut wird und sich deshalb bei der nachfolgenden Replikation in vivo keine Nachkommen mehr von ihm ableiten können. Dadurch wird eine spezielle Selektionsstrategie gegen diesen Strang überflüssig.

Nach den beschriebenen Schritten (und eventuell dem Wiederauffüllen der Lücke im Ringmolekül) wird ein beliebiger Bakterienstamm mit dem resultierenden Molekülgemisch transformiert.

Es gibt weitere Möglichkeiten, das an Position C geschnittene Molekül (Fig. 1, Stufe 1) so zu modifizieren, daß es (während der In-Vitro-Mutagenese) nicht ligierbar, wohl aber exonucleolytisch abbaubar ist. So können z. B. die 3'-Enden der DNA durch Einbau z. B. eines Didesoxynucleotids mit Hilfe einer DNA-Polymerase mit 3'-exonucleolytischer Aktivität (z. B. Klenow-Enzym, T4-DNA-Polymerase) für die Ligation maskiert werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren gibt es keine Beschränkungen hinsichtlich des Typs (Substitution, Deletion oder Insertion) und der Position der angestrebten Mutation. Es sind jedoch vier Restriktionssequenzen (A - D, Fig. 1) notwendig. Sie dürften in der Praxis in jedem Plasmid zu finden sein. Sollten keine zur Position der angestrebten Mutation günstig gelegene Sequenzen vorhanden sein, können bei jedem rekombinanten Plasmid (Hybridplasmid) die zur Insertion der Fremd-DNA verwendeten Schnittstellen als Sequenzen A und B benutzt werden. Eine (oder beide) dieser Schnittstellen könnte auch als Sequenz D fungieren, falls keine günstiger gelegene Restriktionsstelle vorhanden ist.

Nach Wahl kann man die Selektion auf eines der beiden komplementären Ringmoleküle (Fig. 1, Stufe 7) auf Kosten der Ausbeute weglassen.

Wenn die Mischung beider komplementären Ringmoleküle mit Lücke (aus Stufe 6 in Fig. 1) zur Mutagenese

verwendet wird, fällt die Ausbeute um einen Faktor von 2.

Lebendmaterial

- 5 DH1 (E. coli) 30
 Expressionsvektor pBEH mit Ap^R-Markergen 31
 pBEH12ILM4 rekombinanter pBEH-Vektor mit pUC12-Polylinker
 und mutiertem cDNA-Gen von hIL2

10 Materialien

Puffer: TE = 10 mM Tris · HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0). RB1 (Restriktionspuffer 1) = 10 mM Tris · HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂ und 0,1 mg/ml BSA. RB2 (Restriktionspuffer 2) = 50 mM Tris · HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA und 50 mM NaCl. KB (Kinasepuffer) = 60 mM Tris · HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂ und 0,1 mg/ml BSA. MB (Mutagenesepuffer) = 25,5 mM Tris · HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 4,44 mM DTT, 1,66 mM ATP und 0,888 mM jedes dNTP (26). TENA = 40 mM Tris-Base, 1 mM EDTA und 20 mM NaOAc (mit HOAc auf pH 8,3 eingestellt).

Oligonucleotide: Die verwendeten Oligonucleotide wurden aus Phosphoramidit-Monomeren auf einem "Geneassembler" der Firma Pharmacia gemäß den Anweisungen des Herstellers synthetisiert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt.

Enzyme: T4-DNA-Polymerase (Pharmacia), T4-DNA-Ligase und alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer Mannheim), T4-Polynucleotidkinase und Exonuclease III aus E. coli (New England Biolabs) und Restriktionsenzyme (Pharmacia, New England Biolabs, BRL bzw. Boehringer Mannheim) waren Handelsprodukte.

25 Medien: LB-Medium und TB-Medium wurden nach Literaturangaben hergestellt (27 und 28).

AGE: Submarine Gele (14 cm Länge × 11 cm × 0,4 cm) wurden in TENA-Puffer mit einem Gehalt an 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei 70 bis 100 V eingesetzt. Für präparative Gele wurde niedrigschmelzende Agarose (BRL) verwendet.

30 Arbeitsweisen

DNA-Isolation von Agarosegelen: Das Protokoll von Wieslander (32) wurde folgendermaßen modifiziert. Banden wurden durch Illumination bei 360 nm sichtbar gemacht und herausgeschnitten. Die Gelstücke wurden bei 65°C geschmolzen. Ein Volumen Phenol, das mit 0,1 M Tris · HCl (pH 7,5) äquilibriert worden war, wurde auf 65°C vorgewärmt und zugegeben. Die Mischung wurde 45 s lang in einen Vortexmischer gegeben und in einer Eppendorf-Zentrifuge 2 min zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Die organische Phase wurde wie oben angegeben mit einem Volumen Wasser extrahiert, das auf 65°C vorgewärmt worden war. Die resultierende wäßrige Phase wurde mit der zuerst angefallenen wäßrigen Phase vereinigt und danach zweimal mit einem Volumen Tris äquilibriertes Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (50 : 48 : 2) und einmal mit Chloroform : Isoamylalkohol (2 : 1) extrahiert. Durch Extraktion mit 1-Butanol wurde die Lösung etwa vierfach konzentriert. Es wurde 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 4,8 mit HOAc) zugegeben; die Nukleinsäure wurde mit drei Volumina Ethanol gefällt, mit 70proz. Ethanol gewaschen, getrocknet und in 0,1 × TE gelöst.

Plasmidisolierung: Das Plasmid wurde nach einer "Minipräparationsmethode" mit drei Phenolextraktionen (ähnlich 34) isoliert.

Linearisierung und Dephosphorylierung des Plasmids: Es wurden 8,7 pmol (20 µg) DNA mit 40 Einheiten Stul 5 h lang bei 37°C in RB1 (ergänzt mit 10 mM DTT und 100 mM NaCl) inkubiert. Vollständiger DNA-Verdau wurde durch AGE (1,5%) verifiziert. Der Restriktionsansatz wurde auf das doppelte Volumen verdünnt. Dabei wurden hinzugefügt: ZnCl₂ auf 1 mM und Tris HCl (pH 9,0) auf 50 mM. Die DNA wurde durch zweifache Inkubation mit je 4 Einheiten Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm je 10 min bei 37°C und 10 min bei 56°C dephosphoryliert. Der Ansatz wurde zunächst durch Phenolextraktion und Ethanolfällung und dann über eine "Quiagen"-Säule (Diagen GmbH, Düsseldorf) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Die DNA wurde schließlich in 0,1 × TE gelöst.

Herstellung des Nicht-Zielssegments: 8 pmol des Plasmids (17,8 µg) wurden simultan mit 37,5 Einheiten EcoRI und 40 Einheiten HindIII 5 h lang bei 37°C in RB2 (ergänzt mit 10 mM DTT) verdaut. Die vollständige DNA-Spaltung wurde wie vorstehend angegeben verifiziert. Die Mischung wurde mit Phenol extrahiert. Die wässrige Phase wurde nach Zugabe eines Glycerin/BPB-Gemischs auf 150 mm² eines horizontalen 0,8proz. niedrigschmelzenden Agarosegels gegeben. Nach der Elektrophorese wurde das Nicht-Zielfragment (das große Fragment) isoliert (vgl. vorstehend). Es wurde schließlich in 280 µl 0,1 × TE aufgenommen. Das entsprach einer DNA-Konzentration von etwa 70 ng/µl.

Bildung von Ringmolekülen mit Lücke: 1 pmol des linearen dephosphorylierten Plasmids und 1 pmol des Nicht-Ziel-Segments wurden auf 175 µl mit Wasser verdünnt. Die Mischung wurde bei 70°C 5 min lang gehalten. Danach wurden 25 µl 1,5 M KCl und 0,1 M Tris · HCl (pH 7,5), vorerwärmt auf 70°C, zugegeben; die Inkubation wurde bei 70°C weitere 3 min lang fortgesetzt. Danach ließ man das Röhrchen bei Raumtemperatur mindestens 3 min lang vor der weiteren Benutzung stehen. Die Bildung der Ringmoleküle mit Lücke wurde mit 1,5proz. AGE bestätigt.

Phosphorylierung mutagener Primer: 20 pmol des mutagenen Primers wurden in 15 µl KB, 10 mM DTT und 33 µM ATP mit 1,25 Einheiten T4-Polynucleotidkinase 20 min lang bei 37°C inkubiert. Nach 10 min bei 70°C

DE 40 24 187 A1

wurde die Mischung auf Eis abgeschreckt. Sie wurde ohne weitere Reinigung zur Mutagenese verwendet.

In-Vitro-Mutagenese: Es wurden 3,0 µl phosphorylierter Primer mit 4,0 µl des die Ringmoleküle mit Lücke enthaltenden Reaktionsgemisches gemischt. Nach 5 min bei 65°C und 3 min bei Raumtemperatur wurden 9,0 µl MB, 2,0 µl Wasser, 1,75 µl T4-DNA-Ligase (1 Einheit/µl) und 0,25 µl T4-DNA-Polymerase (4,4 Einheiten/µl) zugegeben; die Mischung wurde 10 min lang bei Raumtemperatur, 110 min lang bei 37°C sowie 10 min lang bei 70°C inkubiert, und anschließend in Eis abgeschreckt. Danach wurde 1 µl (1 Einheit) Exonuclease III zugeetzt, 15 min bei 37°C sowie 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend wieder in Eis abgeschreckt.

Linearisierung der unerwünschten Ringmoleküle: Dem In-Vitro-Mutageneseansatz wurden 2,9 µl Wasser, 2,5 µl 100 mM DTT, 3 µl 1 M NaCl, 0,6 µl 100 mM MgCl₂ und 1 µl XhoI (10 Einheiten µl) zugeetzt. Nach 30 min bei 37°C wurden 2 µl 150 mM EDTA hinzugefügt.

Transformation: Es wurden 1 µl des Linearisierungsansatzes verwendet, um direkt 80 µl kompetente Zellen *E. coli* DH1 gemäß den gemachten Angaben zu transformieren (30 und 33). Man plattierte auf LB-Platten mit Ap (50 µg/ml) und erhielt ca. 50 Kolonien.

Mutantenanalyse: Von einigen Kolonien aus der Transformation ließ man Übernachtskulturen wachsen; Plasmide wurden in kleinem Maßstab isoliert und durch Restriktionsverdau oder eine geeignete Einzelbasensequenzierung auf die Mutation hin analysiert.

Nachstehend wird die Erfindung mit Figuren und Beispielen näher erläutert.

Fig. 1 Schematische Erläuterung des Mutageneseverfahrens. A, B, C und D bezeichnen Restriktionsstellen. Bei den ds-Molekülen bezeichnen die schwarzen Bereiche Zielsegmente und die weißen Bereiche Nicht-Zielsegmente für die Mutagenese. Die linearen Produkte, die beim Rehybridisierungsschritt anfallen, sind der Klarheit halber weggelassen. Die Position der Mutation ist durch einen Punkt markiert.

Fig. 2 Für Mutagenesen verwendetes Plasmid. Die schwarzen Segmente bezeichnen das IL2-Gen. Benutzte Restriktionsstellen sind angegeben.

Fig. 3 Überprüfung der Bildung von Ringmolekülen mit Lücke durch AGE. Bahn 1: Mischung des Stul-linearisierten Plasmids (lin) und des EcoRI/HindIII-Nicht-Zielfragments (fr); Bahn 2: Wie Bahn 1, jedoch nach dem Denaturierungs/Renaturierungs-Schritt (gc = Ringmolekül mit Lücke); Bahn 3: Vergleichssubstanzen: lineares Plasmid (lin) und offen zirkuläres Plasmid (oc).

Beispiel 1

Ausgegangen wurde von einem eukaryotischen Expressionsvektor (31), in den das cDNA-Gen von hIL2 eingesetzt worden war. Das resultierende Plasmid pBEH12IL (Fig. 2) oder Mutanten dieses Plasmids wurden zur Mutagenese verwendet.

Das Plasmid wurde mit Stul linearisiert und dephosphoryliert. In einem Parallelansatz wurde das Plasmid mit EcoRI und HindIII gespalten; das Nicht-Zielfragment (großes Fragment) wurde durch AGE isoliert. Beide DNA-Moleküle wurden gemischt, denaturiert und renaturiert. Die Bildung von Ringmolekülen mit Lücke wurde durch AGE bestätigt (Fig. 3).

Mit dem Renaturierungsgemisch wurde die Hybridisierung des mutagenen Oligonucleotids durchgeführt. Dieses Oligonucleotid enthielt eine Insertion von 39 Nukleotiden (nt). Die Längen seiner hybridisierenden Segmente betrugen 18 nt (5') bzw. 13 nt (3'). Das Auffüllen der Lücke und die Ligation wurden durch T4-DNA-Polymerase bzw. T4-DNA-Ligase katalysiert. Im Anschluß an diese Reaktionen wurde so lange mit Exonuclease III inkubiert, bis an dem das mutagene Oligonucleotid enthaltende Ringmolekül der Wildtyp-Strang bis über die im Komplementärstrang mutierte Stelle hinaus abgebaut worden war. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit XhoI inkubiert, wodurch das Ringmolekül, das nicht mutiert sein kann, linearisiert wurde, während das komplementäre, mutierte Ringmolekül zirkulär blieb. Die resultierenden Reaktionsmischungen wurden zur Transformation des Stammes DH1 herangezogen (30).

Man präparierte die Plasmide einiger der resultierenden Kolonien und analysierte sie auf die gewünschte Mutation. Dazu führte man eine Restriktionsanalyse durch, da die Insertion neue Restriktionsschnittstellen einführt. Insgesamt wurden 77 Klone analysiert, von denen 44 positiv waren, was einer Mutagenesegesamtausbeute von 57% entsprach.

Abkürzungen

AGE Agarose-Gelelektrophorese
Ap Ampicillin
bp Basenpaare
BPB Bromphenolblau
BSA Rinderserumalbumin
ds doppelsträngig
DTT Dithioerythritol
hIL2 Humaninterleukin-2
nt Nukleotide
ss einzelsträngig

References

1. Kramer, W., Schughart, K. and Fritz, H.-J. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 6475—6485.
2. Norris, K., Norris, F., Christiansen, L. and Fiil, N. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 5103—5112.

3. Zoller, M. J. and Smith, M. (1984) *DNA* 3, 479—488.
4. Marmenout, A., Remaut, E., van Boom, J. and Fiers, W. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195, 126—133.
5. Hirose, S., Kazuyuki, T., Hori, H., Hirose, T., Inayama, S. and Suzuki, Y. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1394—1397.
6. Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.-W., Kramer B., Pflugfelder, M. and Fritz, H.-J. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 9441—9456.
7. Kunkel, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488—492.
8. Carter, P., Bedouelle, H. and Winter, G. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 4431—4443.
9. Sayers, J. R., Schmidt, W. and Eckstein, F. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 791—802.
10. Sayers, J. R., Schmidt, W., Wendler, A. and Eckstein, F. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 803—814.
11. Tsurushita, N., Maki, H. and Korn, L. J. (1988) *Gene* 62, 135—139.
12. Vandeyar, M. A., Weiner, M. P., Hutton, C. J. and Batt, C. A. (1988) *Gene* 65, 129—133.
13. Almouzni, G., Mousseron-Grall, S. and Méchali, M. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 8525—8539.
14. Oostra, B. A., Harvey, R., Ely, B. K., Markham, A. F. and Smith, A. E. (1983) *Nature* 304, 456—459.
15. Wallace, R. B., Johnson, P. F., Tanaka, S., Schöld, M., Itakura, K. and Abelson, J. (1980) *Science* 209, 1396—1400.
16. Dalbadie-McFarland, G., Cohen, L. W., Riggs, A. D., Morin, C., Itakura, K. and Richards, J. H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6409—6413.
17. Lewis, E. D., Chen, S., Kumar, A., Blanck, G., Pollack, R. E. and Manley, J. L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7065—7069.
18. Hollenberg, S. M., Lai, J. S., Weickmann, J. L. and Date, T. (1984) *Anal. Biochem.* 143, 341—349.
19. Morinaga, Y., Franceschini, T., Inouye, S. and Inouye, M. (1984) *Bio/Technology* 2, 636—639.
20. Foss, K. and McClain, W. H. (1987) *Gene* 59, 285—290.
21. Mandecki, W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7177—7181.
22. Chang, G.-J. J., Johnson, B. J. B. and Trent, D. W. (1988) *DNA* 7, 211—217.
23. Bellini, A. V., de Ferra, F. and Grandi, G. (1988) *Gene* 69, 325—330.
24. Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 7351—7367.
25. Dunning, A. M., Talmud, P. and Humphries, S. E. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 10 393.
26. Geisselsoder, J., Witney, F. and Yuckenberg, P. (1987) *Bio-Techniques* 5, 786—791.
27. Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*, p. 433, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
28. Tartof, K. D. and Hobbs, C. A. (1987) *focus* 9(2), 12.
29. Messing, J. (1983) *Meth. Enzymol.* 101, 20—78.
30. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557—580.
31. Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M. and Hauser, H. (1988) *Gene* 68, 213—219.
32. Wieslander, L. (1979) *Anal. Biochem.* 98, 305—309.
33. Hofer, B. (1987) *Eur. J. Biochem.* 167, 307—313.
34. Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9, 2989—2998.
35. Sugimoto, M., Esaki, N., Tamaka, H. and Soda, K. (1989) *Anal. Biochem.* 179, 309—311.
36. Sliat, S. N., Fung, M., Shen, S.-H. and Lebel, S. (1990) *Anal. Biochem.* 185, 194—200.
37. Olsen, D. B. and Eckstein, F. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1451—1455.
38. Nelson, R. M. and Long, G. L. (1989) *Anal. Biochem.* 180, 147—151.
39. Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G. and Galas, D. J. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 6545—6551.
40. Tomic, M., Sunjevaric, I., Savtchenko, E. S. and Blumenberg, M. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 1656.

Patentsprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Plasmid-Konstrukts für eine oligonucleotid-gerichtete Mutagenese, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - (a) das Plasmid an einer vorzugsweise nur einmal vorkommenden Schnittstelle (C) schneidet, die außerhalb des zu mutagenisierenden Bereichs liegt, und die Schnittstelle derart modifiziert, daß sie nicht mehr von einer Ligase geschlossen werden kann,
 - (b) aus dem gemäß Stufe (a) einzusetzenden Plasmid den zu mutagenisierenden Bereich herausschneidet, den herausgeschnittenen Bereich entfernt und das geschnittene Restplasmid isoliert,
 - (c) das gemäß Stufe (a) geschnittene und modifizierte Plasmid und das gemäß Stufe (b) erhaltene geschnittene Restplasmid mischt, durch De- und Rehybridisierung der DNA-Doppelstränge zwei partiell einzelsträngige komplementäre Ringmoleküle ("gapped circles") bildet, die den Zielbereich der Mutagenese in einzelsträngiger Form enthalten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Schneiden der Schnittstelle (C) die Schnittstelle dadurch modifiziert, daß man die 5'-Phosphatreste abspaltet oder das 3'-Ende maskiert.
3. Verfahren zur Herstellung eines mutierten Plasmids, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - (a) das Plasmid an einer vorzugsweise nur einmal vorkommenden Schnittstelle (C) schneidet, die außerhalb des zu mutagenisierenden Bereichs liegt, und die geschnittene Schnittstelle derart modifiziert, daß sie von einer Ligase nicht mehr ligiert werden kann, indem man beispielsweise die 5'-Phosphatreste abspaltet oder das 3'-Ende maskiert,
 - (b) aus dem gemäß Stufe (a) einzusetzenden Plasmid den zu mutagenisierenden Bereich herausschneidet, den herausgeschnittenen Bereich entfernt und das geschnittene Restplasmid isoliert,

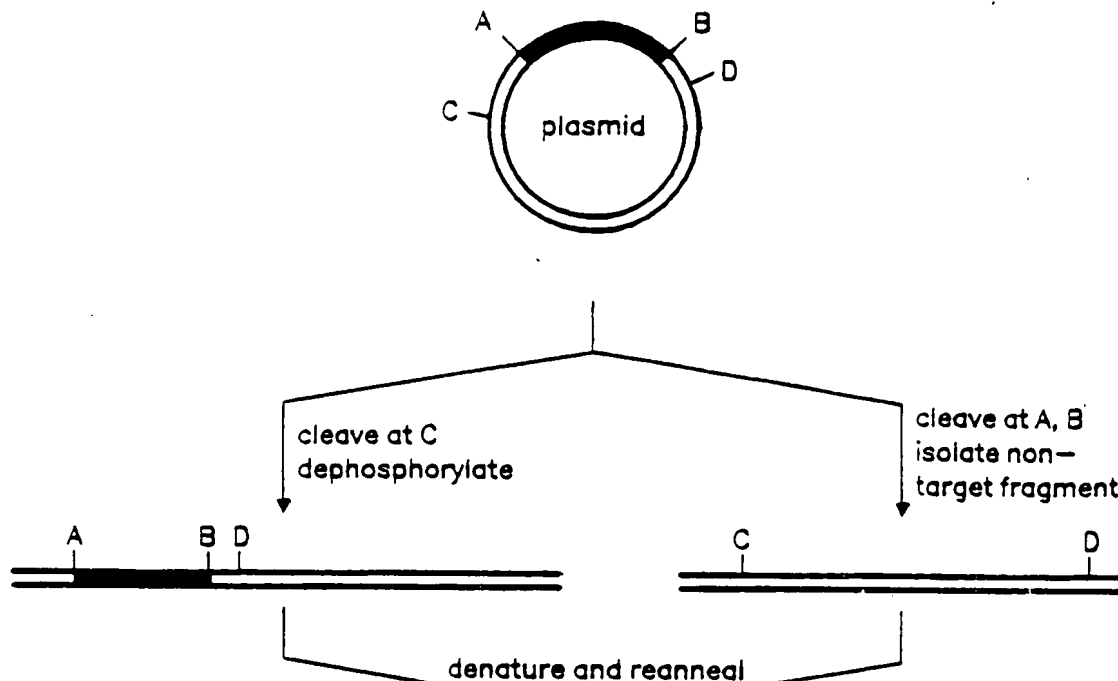
- (c) das gemäß Stufe (a) geschnittene und modifizierte Plasmid und das gemäß Stufe (b) erhaltene geschnittene Restplasmid mischt, durch De- und Rehybridisierung der DNA-Doppelstränge zwei partiell einzelsträngige komplementäre Ringmoleküle ("gapped circles") bilden, die den Zielbereich der Mutagenese in einzelsträngiger Form enthalten,
- (d) an den einzelsträngigen Bereich des einen Ringmoleküls ein mutagenes Oligonucleotid bindet,
- (e) das erhaltene Substratgemisch enzymatisch zu vollständig doppelsträngigen zyklischen Plasmiden ergänzt,
- (f) einem partiellen exonucleolytischen Abbau unterwirft und
- (g) mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen inkubiert, deren Erkennungssequenzen in dem Ringmolekül, das den mutierten Strang enthält, nur solange vorkamen, solange der mutierte Teil dieses Ringmoleküls nicht in Stufe (f) einzelsträngig gemacht worden war, und dadurch selektiv nur das andere Ringmolekül linearisiert und gegebenenfalls entfernt,
- (h) und das verbliebene Ringmolekül in vivo oder in vitro komplettiert.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (h) mit der gemäß dem Verfahren nach Anspruch 3, Stufe (g), erhaltenen Reaktionsmischung einen beliebigen Bakterienstamm transformiert, ein Kulturmedium mit dem Transformationsprodukt inokuliert und
- (i) die transformierten Zellen auf das in gewünschter Weise mutierte Plasmid analysiert.
5. Verfahren zur Herstellung eines mutierten Plasmids, dadurch gekennzeichnet, daß man von einem gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2 erhaltenen Plasmid-Konstrukt ausgeht und die Stufen (d) bis (h) oder (i) gemäß Anspruch 3 bzw. 4 durchführt.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zwischen den Stufen (g) und (h) nach Inaktivierung oder Abtrennung des Restriktionsenzym die Lücke im verbliebenen Ringmolekül mit Hilfe einer DNA-Polymerase wieder auffüllt.
7. Mutagenese-Kit, enthaltend oder bestehend aus einem Plasmid-Konstrukt, das nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2 erhältlich ist.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

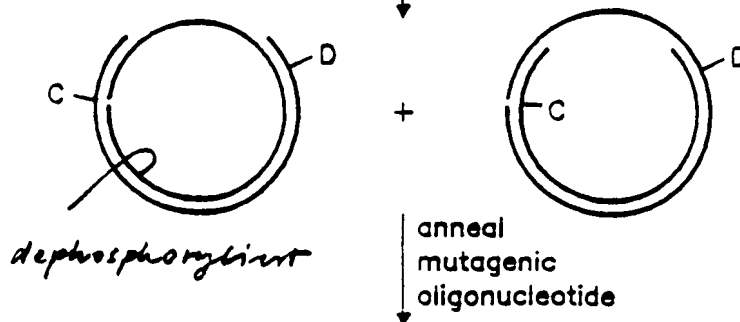
STEP

1/2

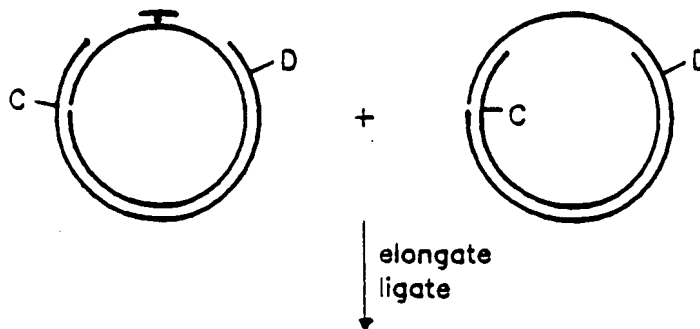
3



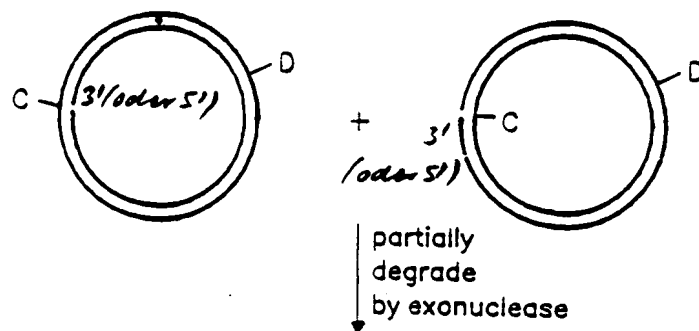
4



5



6



7

